



xfw

Docket No.: NHL-NP-46
Serial No.: 10/816,591

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

EXAMINER: Anne Marie Sabrina Wehbe
ART UNIT: 1653
SERIAL NO.: 10/816,591
FILING DATE: April 1, 2004
INVENTORS: Laura FUERTES-LÓPEZ and Marcos TIMÓN-
JIMENÉZ
TITLE: DNA EXPRESSION CONSTRUCT FOR THE
TREATMENT OF INFECTIONS WITH LEISHMANIASIS

Greensburg, Pennsylvania 15601

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

February 6, 2007

TRANSMITTAL LETTER

Sir:

Please find enclosed herewith the following documents relating to the above-cited case:

- 1) a certified copy of Federal Republic of Germany Patent Application No. 101 56 679.4, filed on November 12, 2001; and Federal Republic of Germany Patent Application No. 101 48 732.0, filed on October 2, 2001.
- 2) a stamped, self-addressed postcard, return of which is requested to acknowledge receipt of the enclosed documents.

TRANSMITTAL LETTER
Page 2

It is believed that no fee is required to file the enclosed documents.

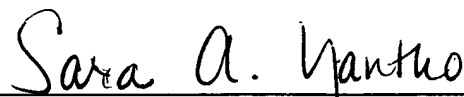
I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on February 6, 2007.

Respectfully submitted,



Nils H. Ljungman, Esq.
Attorney for Applicant[s]
Reg. No. 25,997
Name of person signing certification
Nils H. Ljungman & Associates
P.O. Box 130
Greensburg, PA 15601-0130
Telephone: (724) 836-2305
Facsimile: (724) 836-2313

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on February 6, 2007.



Signature

Sara A. Yantko

Name of person mailing paper or fee

2. 6. 07

Date

DEUTSCHE REPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung DE 101 56 679.4 über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 56 679.4

Anmeldetag: 12. November 2001

Anmelder/Inhaber: MOLOGEN Forschung-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, 14195 Berlin/DE

Bezeichnung: Genetischer Impfstoff gegen Leishmania major

Priorität: 02. Oktober 2001 DE 101 48 732.0

IPC: A 61 K 48/00; A 61 P 33/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. November 2006
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

A 916
03/00
EDV-L


Stark

Genetischer Impfstoff gegen Leishmania major

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Immunisierung gegen Leishmaniose auf DNA-Basis.

- 5 Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden. Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller HIV-Patienten erkranken an visceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste
- 10 parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken.

Chemotherapie als Behandlungsmethode zeigt nur einen geringen Effekt.

Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

- 15 Das Prinzip der Immunisierung beruht auf der Wiedererkennung von Strukturen bereits erfolgreich bekämpfter Erreger. Zwei Hauptarme der Immunabwehr können dabei unterschieden werden: der humorale, welcher auf der Synthese von Antikörpern beruht, die in der Lage sind, im extrazellulären Raum befindliche Bakterien zu

bekämpfen und der zelluläre, der im Wesentlichen auf der Aktivität von T-Lymphozyten des Immunsystems beruht. T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Zellen zu erkennen. Die humorale Immunabwehr wird auch als Th2 pathway und die zelluläre Immunabwehr als Th1 pathway bezeichnet. Die Impfung bzw. Immuntherapie von Leishmaniose, deren Ursache intrazelluläre Parasiten sind, sollte durch die Erzeugung einer Th1 typischen Immunreaktion möglich sein. Im Stand der Technik wird vielfach auf die Bedeutung der Erzeugung einer Th1 Antwort in der Therapie oder Prävention von Leishmaniose hingewiesen. (Handman et al., J Immunol 160: 3949-57, Gurunathan et al., Nature Med: 4(12): 1409-15). Zur Förderung der Auslösung einer Th1-typischen Immunantwort wird auf das kostimulatorische Zytokin IL-12 als unerläßliches Adjuvanz verwiesen (Parker et al., J. Immunol. 140: 896-902).

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. BALB/c Mäuse sind ein gutes Modell zum Studium der Leishmaniose. Es bestehen im Infektionsverlauf und der Läsionsentwicklung sehr große Ähnlichkeiten zum Menschen. Die immunologische Reaktion in Mäusen auf diese Infektion, scheint der im Menschen und wahrscheinlich auch der in Hunden zu gleichen (Cox, Int. J. Parasitol. 263: 1147-1157). Verwendete Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med. 168: 1675-1684), gp 46 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61: 3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 oder auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). LACK ist ein 36 kDa Antigen von Leishmanien, das hochkonserviert ist und in allen verwandten Leishmaniaarten zu finden ist. Exprimiert wird es sowohl in der parasitären Promastigote und Amastigote, den beiden Stadien des parasitären Zyklus im Wirt. Um die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th1 zu fördern, setzten Gonzalo et al. Vaccinia Virus als virale Genfahre und IL-12 als Adjuvanz ein. Als Immunogen wurde p36/LACK Antigen benutzt. Verschiedene Impfregime wurden zusammengestellt. Das erfolgreichste Impfregime, Erstimmunisation mit p36 Protein, Zweitimmunisation mit Vaccinia Virus, kodierend für p36 und IL-12, führte zu einer durchschnittlichen Verkleinerung der Läsionen um 52% im Vergleich zu ungeimpften Mäusen. Den größten Infektionsschutz wiesen die Tiere auf, die den höchsten IgG2a Antikörpertiter hatten (Gonzalo et al., Microbes and Infection: 3 (9): 701-711).

Zum Einschleusen der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

- 5 Biologische Mittel zur Transfektion, sog. Genfähren, sind virale Vektoren, Plasmide oder kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte, die im folgenden MIDGE® genannt werden (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0914 318 B1).

- 10 Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Sie enthalten neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA, üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Diese bakterielle DNA hat den Nachteil, dass sie immunstimulatorische Sequenzen ("ISS", z.B. nichtmethylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide, „CpG“) enthalten kann. Bei Immunsuppression ist genau diese Wirkung nicht erwünscht (ausführlich beschrieben in DE 199 35 756). Bei der Verwendung von Genexpressionskonstruk-
- 15 ten auf Basis von Plasmid-DNA besteht zudem das inhärente Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist.

- 20 Die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz am häufigsten eingesetzten Genfähren sind virale Vektoren. Jedoch stehen die mit deren Einsatz verbundenen Sicherheitsrisiken einer breiten Anwendung in erheblichem Maße entgegen. Es ist bekannt, dass ein hohes Risiko einer cytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfizierten Zellen besteht. So führte die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch zum Tod des Patienten; offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518). Weiterhin ist durch Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen. Außerdem können die viralen Bestandteile selbst immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystems des Patienten führt.
- 25

- 30 Neben diesen Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfermethoden bedingt sind, ist es bisher trotz aller Bemühungen noch nicht gelungen, einen effektiven und sicheren Impfschutz gegen Leishmaniose zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches ein sicheres, effektives und schützendes Impfen gegen Leishmaniose ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale des unabhängigen Anspruchs gelöst, insbesondere indem das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Diese besteht aus der kodierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls Terminationssequenzen, so dass das Konstrukt nur die für die Expression des gewünschten Gens notwendige Information enthält (vgl. EP 0 941 318 B1). Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass das Genexpressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist, welches vorzugsweise eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören. Besonders bevorzugt ist eine Kernlokalisationssequenz, insbesondere

- 15 • Die ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellende Peptidsequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin = Seq ID 3) aus dem Simian Virus SV-40. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt.
- 20 • oder das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment (YGRKKRRQRRR = Seq ID 2) des HIV-1 Genprodukts TAT.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten.

25 Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben und diskutiert.

Die überraschende Wirkung des erfindungsgemäßen Arzneimittels wird anhand der Darstellungen gem. der Figuren deutlich. Dabei bedeuten:

pMOK p36	Plasmid kodierend für p36 Antigen
Mp36-NLS	MIDGE kodierend für p36 Antigen mit NLS Peptid gekoppelt
pMOK ctr	Kontrollplasmid kodierend für HBsAg
rVVp36	rekombinanter Vaccinia Virus kodierend für p36
5 Phosphat	Phosphatpuffer als Kontrolle
Kontrolle +	Positivkontrolle, mit L. major infizierte Seren von Mäusen
Kontrolle -	Negativkontrolle, Seren unbehandelter Mäuse

Es zeigt:

10 Fig. 1: die Bestimmung des Gesamt IgG Titer vor Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten. Nur die Impfregime, die eine Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus beinhalten, zeigen einen messbaren Antikörpertiter.

15 Fig. 2: Bestimmung des Gesamt IgG Titer nach Belastungsinfektion. Alle Impfprotokolle zeigen eine meßbare Antikörperantwort, wobei der höchste Titer an zirkulierenden Antikörpern von MIDGE p36-NLS / MIDGE p36-NLS ausgelöst wird.

20 Fig. 3: das Verhältnis der Antikörper-Isotypen IgG 2a und IgG 1 nach Zweitimmunisierung und Belastungsinfektion mit L. major Promastigoten. Überraschenderweise lösen die mit dem NLS-Peptid gekoppelten MIDGE eine nach der Antikörper-Isotypenverteilung zytotoxische Immunantwort (Th1) aus, die sich von der durch das Regime pMOKp36/rVVp36 ausgelösten nur gering unterscheidet.

25 Fig.4: die Entwicklung der Läsionen in einem Zeitraum von 8 Wochen nach der Belastungsinfektion. Dabei bewirken die Impfprotokolle basierend auf MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS und pMOK p36/ rVV p36 den längsten Schutz gegen eine Infektion mit Leishmania major. Die Schutzwirkung wird durch eine deutlich verzögerte Läsionsentwicklung sichtbar. Der wirksamste und langanhaltendste Schutz wird jedoch durch MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht.

Fig. 5: die Größe der Läsionen nach Woche 8. In der achten Woche nach der Belastungsinfektion ist die Läsionsgröße bei den mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS geimpften Tieren um 80% kleiner als bei der ungeimpften Kontrollgruppe. Es konnte sogar eine 11 prozentige Steigerung des Schutzes vor *L. major* im Vergleich mit der mit pMOK p36/rVV p36 geimpften Gruppe festgestellt werden.

Im einzelnen:

Es wurde untersucht, ob die Modifikation der minimalistischen Expressionskassetten mit Peptiden eine Änderung der Stärke oder Ausrichtung der Immunantwort zu erreichen vermag. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde versucht, verschiedene Peptide und andere organische Moleküle an die MIDGE kovalent zu koppeln.

So ist es gelungen durch kovalente Kopplung des Kernlokalisierungssignals (NLS) aus dem SV 40 Virus an für HBsAg kodierende MIDGE, einen 10- bis 15-fach erhöhten Antikörpertiter nach intramuskulärer Applikation nachzuweisen (Schirmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun.79 (5-6): 343-50).

In einem Impfversuch in Mäusen wurden verschiedene Genexpressionskonstrukte, die für das Antigen p36 LACK kodierten, getestet. So wurden mit NLS Peptid gekoppelte MIDGE (MIDGE p36-NLS), Plasmid (pMOKp36) und rekombinanter Vaccinia Virus (rVVp36) eingesetzt. Um einen möglichst hohen Immunschutz zu erreichen, wurden verschiedene Impfreime formuliert. Parameter waren die Stärke des Th2/Th1 shifts und die erreichte Schutzwirkung, die anhand der Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion mit *Leishmania major* Promastigoten ermittelt wurde. Neben der aus dem Stand der Technik bekannten Methode der Erstimmunisierung mit Plasmid und der Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus (rVV), sollte getestet werden, ob ein ähnlicher Immunschutz auch mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel erreicht werden kann.

Die Antikörpertiter für Gesamt IgG als Maß für die Auslösung einer Immunantwort wurden mittels ELISA bestimmt. Dabei konnten vor der Belastungsinfektion mit *Leishmania major* Promastigoten nur durch zwei Impfreime meßbare Antikörper erzeugt werden (s. Fig. 1). In beiden Fällen wurde rekombinanter Vaccinia Virus als

Zweitimmunisation (Boost) verwendet. Verschiedene Studien beweisen, dass zirkulierende Antikörper allein noch nichts über eine vermeintliche Schutzwirkung aussagen. Ein Zusammenhang zwischen zirkulierenden Antikörpern und Schutz vor Infektion kann erst nach der Belastungsinfektion gesehen werden. In Fig. 2 sind die Antikörpertiter nach der Belastungsinfektion mit *L. major* dargestellt. Alle Impfreime zeigen meßbare Antikörpertiter, wobei der höchste mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht werden konnte.

Die Antikörperisotypen IgG1 und IgG2a wurden bestimmt, um einen möglichen Th2/Th1 shift in der Immunantwort nachzuweisen. Die Isotopenverteilung von Immunglobulin gamma (IgG) für ein bestimmtes Antigen spiegelt die Ausprägung der gesamten Immunantwort gegen dieses Antigen wider. Dabei sind IgG -1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten, ein erhöhter Spiegel von Subtyp IgG 2a ist typisch für eine zelluläre Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFN γ und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden.

Gemäß Fig. 3 sind mit dem NLS Peptid gekoppelte MIDGE Vektoren in der Lage, eine zelluläre (Th1) Immunantwort auszulösen. Wie dargestellt, ist der zelluläre Arm der Immunantwort entscheidend in der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten. Die von MIDGE p36-NLS ausgelöste Verschiebung der Th2 in Richtung Th1 Antwort, unterscheidet sich nur gering von der durch pMOKp36/rVVp36 ausgelösten.

Zur Beurteilung der erreichten Schutzwirkung wurde eine Belastungsinfektion mit *Leishmania major* Promastigoten durchgeführt. Anhand des Größenwachstums der Läsionen in Abhängigkeit von der Zeit in Wochen wurde der Impferfolg bewertet. Dabei zeigte sich, daß die mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS behandelten Mäuse die vom Durchmesser kleinsten Läsionen aufwiesen, also MIDGE p36-NLS im Impfreime MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS den längsten Impfschutz bewirkt (s. Fig. 4 u. 5).

Diese Ergebnisse sind insofern sehr überraschend, da das erfindungsgemäße Arzneimittel in seiner Wirkung das derzeit im Stand der Technik als „bestes“ bezeichne-

te Impfregime der Zweitimmunisierung (Boost) mit rekombinanten Vaccinia Virus übertrifft, und die möglichen Nebenwirkungen, die von Plasmiden und attenuierten Viren ausgehen, vermeidet (Gonzalo et al., Microbes and Infection:3 (9) :701-711). Gleichzeitig ist das erfindungsgemäße Arzneimittel vergleichbar bis besser, in seiner
5 Schutzwirkung. Die Vermeidung von potentiellen Nebenwirkungen durch Plasmide und rekombinanten Viren, ist der entscheidende Vorteil des erfindungsgemäßen Arzneimittels, die Herstellung ist einfacher und kostensparender, zudem ist das erfindungsgemäße Mittel wesentlich sicherer.

Ausführungsbeispiele

10 Beispiel 1.1: Klonierung des Plasmids pMOKp36

Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 6),

15 Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCG
(= Seq ID 7)

2. PCR ca. 950 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 8),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG (= Seq ID 9)

20 Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere
Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit Bpil geschnitten.

Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden zusammenligiert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den
25 Namen pMOKp36 (= Seq ID 1).

Beispiel 1.2: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (wobei xT für aminomodifizierte Thyminbase mit C₂ – Amminolinker steht, = ODN 1 = Seq ID 4) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl₂, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE p36-NLS Konstrukte verwendet.

Beispiel 1.3: Herstellung der MIDGE p36-NLS

MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOKp36 wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1 = Seq ID 4) und 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2 = Seq ID 5) durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70°C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

Beispiel 1.4: p36 Antikörperbestimmung in Mäusen

MIDGE p36-NLS, pMOKp36 und rekombinanter Vaccinia Virus p36 (rVV) wurden in weibliche (Balb/c) Mäuse nach folgendem Impfreime injiziert.

Tabelle 1

Gruppen	Erstimmunisierung (prime)	Zweitimmunisierung (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS
3	pMOK Kontrolle	pMOK Kontrolle
4	pMOKp36	rVVp36
5	MIDGE p36-NLS	rVVp36
7	Phosphatpuffer	Phosphatpuffer

Je Gruppe wurden 10 Mäuse eingesetzt.

Die verwendeten DNA Mengen betrugen für:

pMOKp36: 100 μ g, i.d.

MIDGE p36-NLS: 54,8 μ g, i.d.

5 rVV p36: 5x10⁷ pfu/Maus, i.p.

und wurden in Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, injiziert.

Nach 2 Wochen erfolgte die Zweitimmunisierung (boost) mit den entsprechenden (s. Tab. 1) DNA Konstrukten. Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungsinfektion mit 5x10⁴ Leishmania major Promastigoten. Diese wurden den Mäusen in
10 die rechte Hinterpfote s.c. injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt.

Acht Wochen nach der Belastungsinfektion wurden von allen Mäusen die Seren gewonnen. Der Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 Antigen und die Bestimmung der IgG 2a und IgG 1 Antikörper, erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption
15 in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406$ nm bestimmt wurde.

Patentansprüche

- 5 1. Arzneimittel zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel ein in eukaryoten Zellen operables Genexpressionskonstrukt enthält, welches für das immunogene p36 LACK Antigen unter Kontrolle einer Promotersequenz kodiert.
- 10 2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei das Genexpressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.
3. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei das Oligopeptid eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören.
- 15 4. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei das Oligopeptid eine Kernlokalisationssequenz trägt.
5. Arzneimittel nach den Ansprüchen 2 bis 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) enthält.
6. Arzneimittel nach den Ansprüchen 2 bis 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz YGRKKRRQRRR enthält.
- 20 7. Arzneimittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Genexpressionskonstrukt ein linear-doppelsträngiges Desoxyribonukleinsäuremolekül ist, welches an beiden Enden des Doppelstrangs durch eine kurze Schleife einzelsträngiger Nukleosidreste kovalent geschlossen ist.
- 25 8. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1 bis 8 zur Immunisierung gegen Leishmaniose.

Fig. 1 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen vor der Belastungsinfektion mit *L. major*

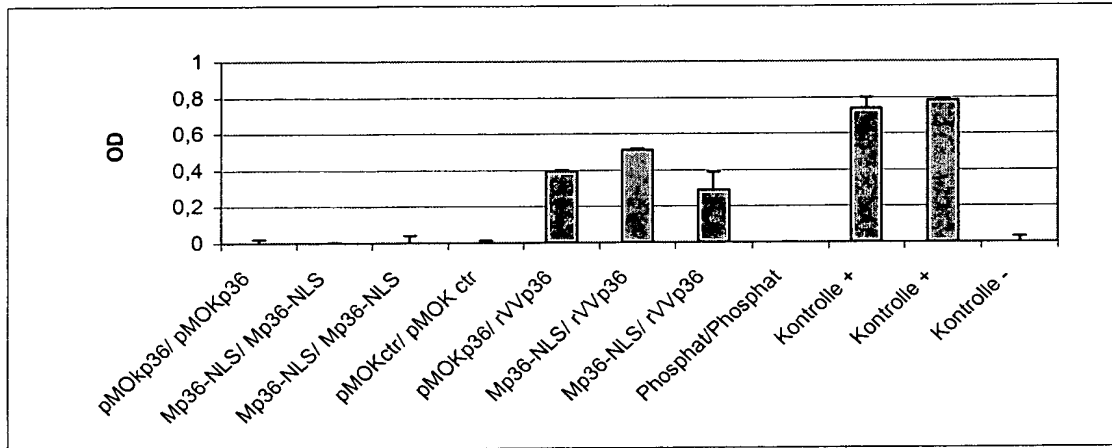


Fig. 2 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen nach der Belastungsinfektion mit *L. major*

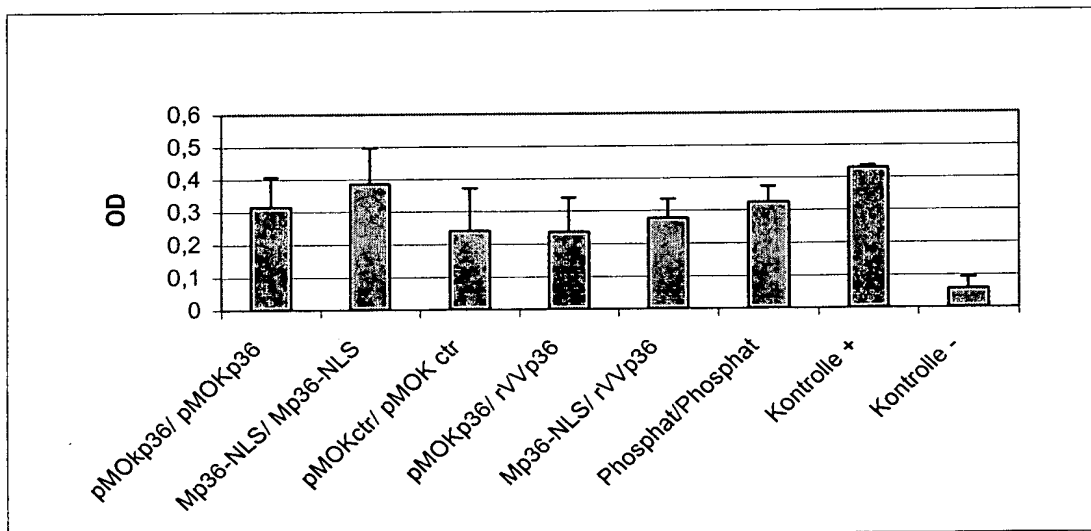


Fig. 3 Verhältnis der Isotypen IgG 2a/IgG 1 gegen p36 LACK Antigen

Impfregime	Isotypenverhältnis
pMOKp36/pMOKp36	0.9
Midge p36-NLS/Midge p36-NLS	1.3
pMOKctr/pMOKctr	1
pMOKp36/rVVp36	1.66
Midge p36-NLS/rVVp36	1.35
Phosphatpuffer/Phosphatpuffer	0.96

Fig. 4 Kinetik der Läsionsentwicklung

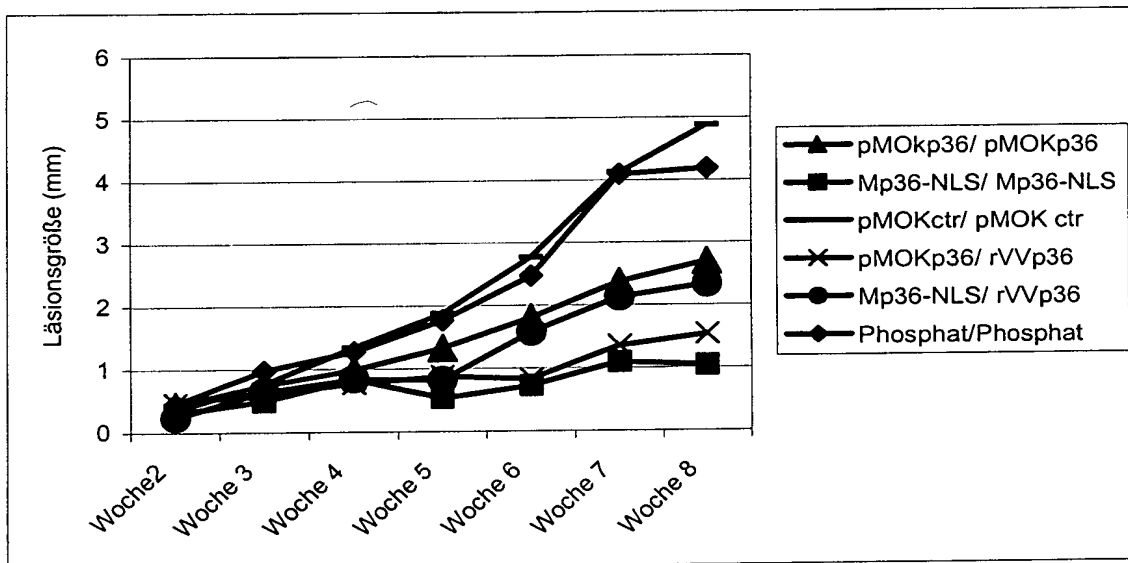
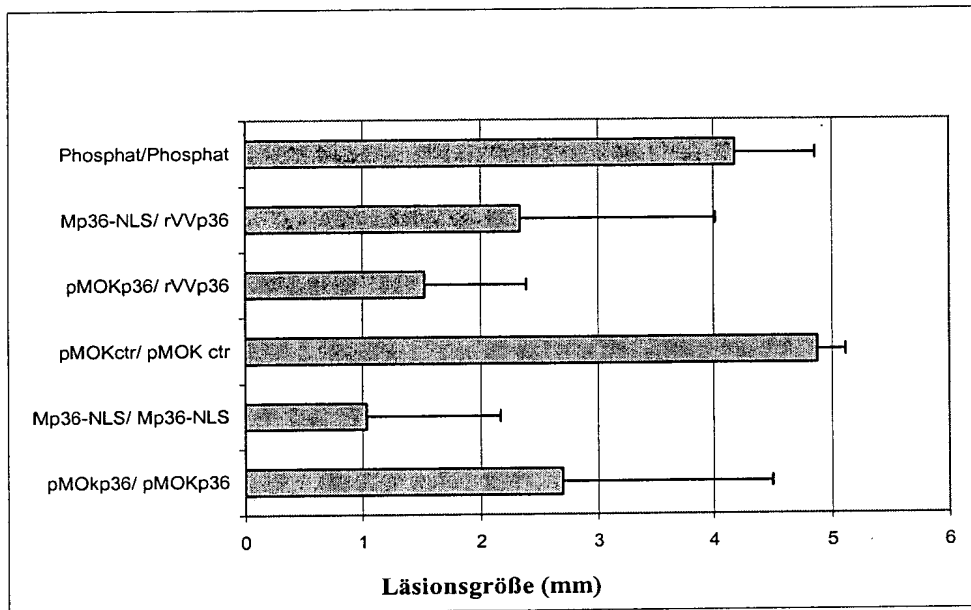


Fig. 5 Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion in Woche 8



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Immunisierung gegen Leishmaniose auf DNA-Basis, wobei das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Das Genexpressionskonstrukt kann zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.

Mologen-Leishmania.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

<130> XI 628/01

<150> DE 101 48 697.9

<151> 2001-10-02

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4791

<212> DNA

<213> Plasmid pSCp36

<220>

<221> misc_feature

<222> (1939)..(1045)

<223> Kanamycin resistance, reverse complementary

<220>

<221> promoter

<222> (2447)..(3243)

<223> CMV

<220>

<221> Intron

<222> (3250)..(3386)

<223>

Molgen-Leishmania.ST25

<220>

<221> misc_feature

<222> (3393)..(4331)

<223> p36 protein

<220>

<221> polyA_site

<222> (4338)..(4539)

<223> poly A site aus SV 40

<400> 1

tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta	60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag	120
aacatgtctc gggaggcctc acgtgacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac	180
cgtaaaaagg ccgcggttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac	240
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg	300
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac	360
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat	420
ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag	480
cccgaccgct gcgccttatc cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac	540
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg	600
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg	660
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc	720
aaacaaacca ccgctggtag cggtgggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgacga	780
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac	840
gaaaactcac gttaagggat tttgggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc	900
cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtct	960
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca	1020
tccatagttg cctgactccc cgtctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat	1080
gcgctgcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc	1140
gccaaactct tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac	1200
accagccgg ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcc ttttccacca tgatattcgg	1260
caagcaggca tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc tcgccttgag	1320
cctggcgaac agttcggctg gcgcgagccc ctgatgtctc tcgtccagat catcctgatc	1380

Mologen-Leishmania.ST25

gacaagaccg	gcttccatcc	gagtacgtgc	tcgctcgatg	cgatgtttcg	cttgggtggtc	1440
gaatgggag	gtagccggat	caagcgtatg	cagccgccgc	attgcatcag	ccatgatgga	1500
tactttctcg	gcaggagcaa	ggtgagatga	caggagatcc	tgccccggca	cttcgcccga	1560
tagcagccag	tcccttcccc	cttcagtgac	aacgtcgagc	acagctgcgc	aaggaacgcc	1620
cgtcgtggcc	agccacgata	gccgcgtgc	ctcgtcttgc	agttcattca	gggcaccgga	1680
caggtcggtc	ttgacaaaaa	gaaccgggag	cccctgcgct	gacagccgga	acacggcggc	1740
atcagagcag	ccgattgtct	gttggtgccc	gtcatagccg	aatagcctct	ccaccaagc	1800
ggccggagaa	cctgcgtgca	atccatcttg	ttcaatcata	atattattga	agcatttatc	1860
aggggtattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	ttagaaaaat	aaacaaatag	1920
gggttccgag	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	attattatca	1980
tgacattaac	ctataaaaaa	aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtctcgcg	cgtttcgggtg	2040
atgacgggtg	aaacctctga	cacatgcagc	tcccggagac	ggtcacagct	tgtctgtaag	2100
cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	2160
gctggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgcgggtgtg	2220
aaataccgca	cagatgcgta	aggagaaaaa	accgcatcag	gcgccattcg	ccattcaggc	2280
tgcgcaactg	ttgggaaggg	cgatcggtgc	gggcctcttc	gctattacgc	cagctggcga	2340
aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	agggttttcc	cagtcacgac	2400
gttgtaaaac	gacggccagt	gccaaagctg	gtctcctccc	ggatcctcaa	tattggccat	2460
tagccatatt	attcattggg	tatatagcat	aatcaatat	tggctattgg	ccattgcata	2520
cgttgtatct	atatcataat	atgtacattt	atattggctc	atgtccaata	tgaccgccat	2580
gttggcattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagttcata	2640
gccccatata	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggcccgcc	ggctgaccgc	2700
ccaacgaccc	ccgcccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatagta	acgccaatag	2760
ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	ttggcagtag	2820
atcaagtgtg	tcatatgcc	agtcggcccc	ctattgacgt	caatgacggg	aaatggcccc	2880
cctggcatta	tgcccagtag	atgaccttac	gggactttcc	tacttggcag	tacatctacg	2940
tattagtcag	cgctattacc	atgggtgatg	ggttttggca	gtacaccaat	gggcgtggat	3000
agcggtttga	ctcacgggga	tttccaagtc	tccaccccat	tgacgtcaat	gggagtttgt	3060
tttggcacca	aatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	taaccccgcc	ccgttgacgc	3120
aatggggcgg	taggcgtgta	cggtgggagg	tctatataag	cagaggtcgt	ttagtgaacc	3180
gtcagatcac	tagaagcttt	attgcggtag	tttatcacag	ttaaattgct	aacgcagtag	3240
gtgctcgagc	aggtaagtat	caagggttaca	agacaggttt	aaggaggcca	atagaaactg	3300
ggcttgtcga	gacagagaag	actcttgcgt	ttctgatagg	cacctattgg	tcttactgac	3360
atccactttg	cctttctctc	cacaggggta	ccatgaacta	cgagggtcac	ctgaagggcc	3420

Mologen-Leishmania.ST25

```

accgcggatg ggtcacctcc ctggcctgcc cgcagcaggc ggggtcgtac atcaaggtgg 3480
tgctgacgtc gcgcgatggc acggccatct cgtggaaagc caaccccgac cgccacagcg 3540
tggaacagcga ctacggtctg ccgagccacc gcctcgaggg ccacaccggc ttcgtgtcgt 3600
gtgtgtcgtt gggccacgcc accgactacg cgctgaccgc gtcctggggac cgctccatcc 3660
gcatgtggga cctgcgcaat ggccagtgcc agcgcaagtt cctgaagcac accaaggacg 3720
tgctcgccgt cgccttctcg ccggacgacc gcctgatcgt gtccgcgggc cgcgacaacg 3780
tgatccgcgt gtggaacgtg gcgggagagt gcatgcacga gttcctgcgc gacggccacg 3840
aggactgggt gagcagcatc tgtttctcgc cgctcgtgga gcatccgatc gtggtgtccg 3900
gcagctggga caacaccatc aaggtatgga acgtgaacgg gggcaagtgt gagcgcacgc 3960
tcaagggcca cagcaactac gtgtccacgg tgacggtgtc gccagacggg tcgctgtgcg 4020
cgtccggcgg caaggacggc gcggcgctgc tgtgggacct gagcaccggc gagcagctgt 4080
tcaagatcaa cgtggagtcg cccatcaacc agatcgctt ctcgccaac cgcttctgga 4140
tgtgcgtcgc gacggagagg tccctgtccg tgtacgacct ggagagcaag gctgtgattg 4200
cggagctgac gccggacggc gcgaagccgt ccgagtgcac ctccattgcc tgggccgccg 4260
acggcaacac tctgtactcc ggtcacaagg acaacctgat ccgctgtgtg tccatctccg 4320
acgccgagta agagctcgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat 4380
gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata 4440
aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca gggtcagggg gaggtgtggg 4500
aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtag aattcagggg gagaccaat 4560
tcgtaatcat ggtcatagct gtttctctgt tgaaattgtt atccgctcac aattccacac 4620
aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaagtgt gagctaactc 4680
acattaattg cgttgcgtc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 4740
cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg c 4791

```

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1, TAT peptide

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 7

Molgen-Leishmania.ST25

<212> PRT

<213> Simian virus 40, NLS peptide

<400> 3

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 1

<220>

<221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> xT = Thymin modified with a reactive amino group

<400> 4

gggagtccag ttttctggac

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 2

<400> 5

aggggtccag ttttctggac

20

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer left

<400> 6

ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct

33

<210> 7

<211> 42

Molgen-Leishmania.ST25

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer right

<400> 7
ttatatgagc tcagaagaca cggacaggga cctcttccgt cg

42

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer left

<400> 8
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct

33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer right

<400> 9
ttatatgagc tcttactcgg ccgctcggaga tgg

33